

文章编号: 1004-0374(2011)04-0348-05

肺干细胞和肺癌干细胞研究进展

常建辉, 孟爱民*

(北京协和医学院/中国医学科学院放射医学研究所, 天津市分子核医学重点实验室, 天津 300192)

摘要:近年来成体干细胞研究进展迅速。肺干细胞和肺癌干细胞在表面标志、分离方法和功能研究等方面也取得了一定进展。在肺组织中, 肺干细胞维持着肺上皮的更新和稳定, 肺脏不同解剖结构存在不同的干细胞, 主要的肺干细胞有气管—支气管干细胞、细支气管干细胞、细支气管肺泡干细胞和肺泡干细胞等, 不同干细胞特异表面标志也不同。根据肿瘤干细胞理论, 目前研究认为肺癌的发生与肺癌干细胞有关, 肺癌干细胞来源于其对应肺干细胞的恶性转化。肺癌干细胞特异标志研究主要集中在侧群细胞、CD133和醛脱氢酶等。与其他成体干细胞相似, 肺癌干细胞维持自我更新以及分化能力的信号通路主要有Wnt、Hedgehog和Notch通路等。肺癌干细胞与肺癌的发生、发展、转移、治疗反应及预后关系, 也取得了一定的进展。该文对肺干细胞和肺癌干细胞研究进展作简要综述。

关键词: 肺干细胞; 肺癌干细胞; 表面标志; 信号通路

中图分类号: R734.2, Q813

文献标识码: A

Research advances on lung stem cells and lung cancer stem cells

CHANG Jian-Hui, MENG Ai-Min*

(Tianjin Key Laboratory of Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Science & Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China)

Abstract: Lung stem cells were very important for the lung epithelium renewal and stabilization. Currently, studies suggest that there were four kinds of lung stem cells in different anatomical site. According to the tumor stem cell theory, the lung cancer was related to the lung cancer stem cell and the lung stem cell. The surface markers and the signaling pathway, which maintain the self-renewal and differentiation, are similar to the other stem cells. At present, the studies of lung cancer stem cell markers were focused on Side Population cells, CD133, and ALDH, and the signal pathways were focused on the key developmental pathways such as the Wnt, Hedgehog, and Notch. In this paper, we summarized the progress of the lung stem cell and the lung cancer stem cells research briefly.

Key words: lung stem cells; lung cancer stem cells; surface markers; signal pathway

肺部组织结构复杂, 上皮组织由40余种细胞构成, 另外呼吸道上皮更新较慢, 更新周期为30~50 d^[1,2], 肺干细胞特异表面标志较难确定, 这给肺干细胞鉴定分离带来一些困难。但近年来肺干细胞和肺癌干细胞在表面标志、分离方法和功能研究等方面也取得了一定进展。研究发现, 在肺不同解剖部位有相应肺干细胞以维持肺部组织更新和损伤后修复^[3]。主要肺干细胞有气管—支气管干细胞、细支气管干细胞、细支气管肺泡干细胞和肺泡干细胞等。

肺癌的发生和维持与肺癌干细胞有关, 不同肺癌干细胞来源于对应解剖部位肺干细胞的恶性转化。肺癌干细胞维持自我更新和分化能力的信号通

收稿日期: 2010-09-17; 修回日期: 2010-10-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(30770645, 30828011, 81072237); 天津市自然科学基金项目(08JCYBJC07300)

*通讯作者: E-mail: aiminmeng00@yahoo.com; Tel: 022-85682353

路与其他组织成体干细胞相似, 主要有 Wnt 通路、Hedgehog 通路和 Notch 通路。

1 肺干细胞

肺组织结构复杂, 有独特的气血交换功能, 分为呼吸部和换气部。呼吸部主要包括气管、支气管、细支气管, 换气部主要是肺泡。不同解剖结构的对应干细胞维持着各部分结构和功能的稳定。下面简要分类和介绍。

1.1 气管—支气管干细胞

气管上皮主要由基底细胞、黏膜分泌细胞和纤毛细胞组成。Bowden^[4]1983年最早发现基底细胞和 Clara 细胞可以分化为纤毛细胞。Hong 等^[5,6]在 KRT14-creER 小鼠的近端气道损伤模型中发现, 基底细胞具有增殖能力, 其对于气道上皮细胞的再生具有重要作用。因此, 基底细胞被认为是气管—支气管的干细胞。基底细胞特异表达 KRT5/14(小鼠)或转录因子 P63(人)表面标志^[7]。

1.2 细支气管干细胞

终末细支气管主要由纤毛细胞和 Clara 细胞等组成。Clara 细胞表达 Clara 细胞特异性蛋白(Clara cell specific protein, CCSP)^[7], 多数 Clara 细胞不具有增殖分化功能, 只有位于细支气管上皮内的神经内分泌小体(neuroepithelial body, NEB)中的神经内分泌细胞(pulmonary neuroendocrine cells, PNEC)和一小群变异 Clara 细胞具有干细胞特性^[8,9], 其中变异 Clara 细胞不表达 Clara 细胞特有的 CYP2F2(CYP2F2 酶, 一种可将萘转化为毒性产物的 P450 细胞色素族)^[10]。Hong 等^[11]在小鼠萘诱导肺损伤模型中发现虽然两者都具有增生和自我更新能力, 但 PNECs 自我更新能力必须有变异 Clara 细胞存在, 在缺少变异 Clara 细胞情况下 PNECs 失去分化能力。

1.3 支气管肺泡干细胞

2005年, Kim 等^[12]首先在小鼠肺支气管肺泡连接区(BADJ)发现了支气管肺泡干细胞(BASCs), BASCs 表达 CCSP 和肺表面活性物质相关蛋白 C(SP-C), 特异细胞表面标志是 CD34⁺ SCA1⁺ CD45⁺ PECAM。BASCs 可以抵抗萘诱导的细支气管损伤, 在上皮损伤修复期间增殖; 体外培养可形成细胞克隆, 具有干细胞特有的自我更新能力, 在不同的体外培养条件下能分化为 Clara 细胞、肺泡 II 型细胞(AT II)和肺泡 I 型细胞(AT I), 提示 BASCs 是远

端肺上皮的干细胞。

1.4 肺泡干细胞

肺泡主要由 ACE I 和 ACE II 细胞构成。Adamson 和 Bowden^[13]及 Evans 等^[14]应用 3H-TdR 脉冲追踪实验发现 ACE II 可以分化为 ACE I 细胞。因此, ACE II 被认为是肺泡干细胞。Reddy 等^[15]研究发现 ACE II 可能存在至少四种亚群, 不同亚群表达不同表面标志和端粒酶活性, 分类还需进一步研究。

目前研究已证明肺中存在多种肺干细胞, 但对不同肺干细胞的特异表面标志和有效的分离方法仍需进一步研究。对肺干细胞在肺的生长发育以及损伤中作用的研究, 可为一些肺干细胞疾病的治疗提供理论依据, 为发展新的治疗方法打下基础。

2 肺干细胞和肺癌干细胞

肺癌主要分为小细胞肺癌和非小细胞肺癌, 非小细胞肺癌又分为肺鳞癌、肺腺癌和大细胞肺癌。肿瘤干细胞理论认为肺癌的发生和维持与肺癌干细胞有关, 不同肺癌干细胞来源于对应肺干细胞的恶性转化^[16,17]。Barth 等^[18]研究发现, 在小鼠肺鳞癌模型中, 肺癌细胞高表达基底细胞特异性表面标志 KRT5/14, 提示肺鳞癌可能起源于基底细胞的恶性转化。与 PNECs 相似, 小细胞肺癌细胞都表达初级神经内分泌因子, 另外两者发生位置相同。提示小细胞肺癌可能起源于 PNECs 的恶性转化^[19,20]。Kim 等^[12]2005年发现 *Kras* 基因能促进细支气管肺泡干细胞的分化, 但 *Kras* 基因的活化也能促进肺腺癌的发生, 并且两者发生部位都是细支气管肺泡结合处, 这提示肺腺癌起源于细支气管肺泡干细胞的恶性转化。

目前已有证据显示有肺癌干细胞的存在, 并且与肺癌发生的解剖部位对应的肺干细胞有相似的细胞学特征和表面标志^[16-20], 但对于肺癌干细胞源于正常肺干细胞的恶性转化还缺乏直接证据, 恶性转化的分子机制需要进一步的研究证明。这对揭示肺癌发生机制和对肺癌预防及治疗有重要的作用, 并可为其他肿瘤发生机制研究提供参考。

3 肺癌干细胞分离鉴定的表面标志

目前还没有发现适当的肺癌干细胞标志, 因此肺癌干细胞的分离和鉴定需要借鉴其他组织干细胞和肿瘤干细胞标志。目前分选和鉴定的方法主要有

以下三种。

3.1 侧群细胞

侧群细胞最早由 Goodell 等^[21]用于骨髓干细胞分离。侧群细胞 (side population cells, SP cells) 是一类可以特异性将 Hoechst 33342 染料快速泵出细胞外的细胞, 广泛分布于多种正常组织、肿瘤组织和细胞系中, 被作为一种通用的干细胞表型标记。在肿瘤干细胞研究中发现, 肿瘤侧群细胞富集肿瘤干细胞^[22,23]。Ho 等^[24]2007年在肺癌干细胞中分离的侧群细胞具有强致瘤性和自我更新能力, 提示分离侧群细胞可作为有效地肺癌干细胞分离方法。但是由于 Hoechst 33342 的细胞毒性作用可能降低目标细胞活性, 并且分离过程对时间十分敏感, 导致实验数据变化较大, 这些都对肺癌细胞侧群细胞能否真正代表肺癌干细胞产生疑问, 需要更进一步的严密实验解释和阐明^[25]。

3.2 CD133

CD133 是细胞表面糖蛋白, 由 5 个跨膜区域和 2 个大的糖基化外环组成。CD133 已被用于筛选造血干细胞、神经干细胞、脑癌干细胞、结肠癌干细胞和前列腺癌干细胞等。Eramo 等^[17]2008 年将其作为肺癌干细胞筛选的表面标志, 自 NSCLC 和 SCLC 标本中分离出少量的 CD133⁺ 细胞, 发现其有高致瘤性和自我更新能力。但是 Meng 等^[26]发现一些肺癌 CD133 阴性细胞也具有自我更新和致瘤能力。另外, 在一些肺癌样本中没有检测到 CD133 阳性细胞^[27]。这些都使 CD133 作为肺癌干细胞表面标志受到质疑。CD133 分子能否作为肺癌干细胞表面标志仍需进一步研究。

3.3 醛脱氢酶

醛脱氢酶 (ALDH) 家族在细胞内氧化乙醛, 在细胞解毒、细胞分裂、药物抗性方面有着重要的作用^[28]。Patel 等^[29]研究发现在肺干细胞恶性转化过程中醛脱氢酶阳性表达。Jiang 等^[30]发现在 NCI-H358 和 NCI-H125 中醛脱氢酶阳性表达细胞群中的细胞致瘤性更强, CD133 阳性细胞比例更高。Moreb 等^[31]应用 siRNA 使肺癌细胞沉默 ALDH 表达后肺癌细胞的分化增殖能力和转移能力下降。以上证据表明 ALDH 是有希望的肺癌干细胞标志。

虽然还有一定争议, 以上三种最有希望成为肺癌干细胞分选标记。另外一些研究提示 uPAR(尿激酶型纤维蛋白酶原激活剂)、PODXL-1(足糖萼蛋白样蛋白 1)、ABCG2(ATP 结合转运蛋白 G 超家族

成员 2) 等分子也是可能的肺癌干细胞表面标志^[32]。

4 肺癌干细胞自我更新和分化信号通路

在干细胞的自我更新过程中, Wnt 通路、Hedgehog 通路和 Notch 通路起着重要的作用。肿瘤干细胞的自我更新也被认为与这几个关键通路有关, 而与肺癌干细胞相关的调节机制研究进展如下。

4.1 Wnt通路

Wnt/ β -catenin 信号通路在一些干细胞比如骨髓干细胞自我更新中有着重要的作用^[33]。最近肺癌干细胞中 Wnt/ β -catenin 通路研究也有一些进展。Reynolds 等^[34]发现在肺发育过程中随着 BASCs 的扩张和细支气管的分化, Wnt/ β -catenin 信号激活。You 等^[35]应用 Wnt 多克隆抗体抑制 Wnt 信号通路可以导致 NSCLC 细胞凋亡。Wnt 信号通路活化在肺癌干细胞自我更新中的作用还需进一步研究。Wnt 信号通路在维持肺癌干细胞致瘤性和自我更新中的作用使其有可能成为有希望的肺癌治疗靶点。

4.2 Hedgehog通路

Hedgehog(Hh) 信号通路由 Hedgehog 配体、两个跨膜蛋白受体 Ptch 和 Smo 以及下游转录因子 Gli 蛋白等组成。Hedgehog 信号通路在胚胎早期发育中发挥重要作用。Pepicelli 等^[36]及 Taipale 和 Beachy^[37]发现在肺的发育过程中, Hedgehog 通路参与肺上皮细胞发育和支气管的分化有关, 表达异常可能会导致肿瘤的发生。Watkins 等^[38]发现在肺部损伤后的修复阶段, 在损伤部位和神经分泌小体会有 Hedgehog 表达, 并且在 SCLCs 中应用环杷明抑制 Hh 通路会使肿瘤细胞的生存能力和致瘤性明显减小。

4.3 Notch通路

Notch 通路在器官发育和组织分化中有重要作用。Collins 等^[39]发现在肺部发展过程中, Notch 可能决定着远端和近端发育速度。Ito 等^[40]应用 *Hes1* 基因敲除小鼠发现, Notch 的抑制导致神经分泌小体的提前和无序的分化。Konishi 等^[41]在小鼠中应用抑制剂抑制 Notch 通路, 发现会导致肿瘤细胞死亡和降低肿瘤细胞生长速度。但是 Zheng 等^[42]在细胞试验中发现, A549 中过度表达 Notch 会导致其增殖性和致瘤性降低。虽然研究还发现 Notch 在肺癌干细胞的发生过程中有一定作用, 但对于 Notch 在肺癌干细胞自我更新中的作用机制还不是很清楚, 仍需要进一步研究。

Wnt 通路、Hedgehog 通路和 Notch 通路在肺癌干细胞自我更新中起着重要作用, 寻找通路特异抑制剂, 可能找到对治疗肺癌有效的药物, 开发新的肿瘤诊断和治疗方法。

5 问题和展望

肺癌是世界上患病人数最多的肿瘤之一, 且目前发病率不断提高^[43]。肺癌传统治疗方法(包括手术、放化疗等)能够清除肿瘤或抑制肿瘤生长, 但是肺癌干细胞对于放化疗更为耐受, 残存的肺癌干细胞使肿瘤复发。由于肺部结构复杂以及肺上皮细胞更新率较低, 肺干细胞研究面临困难较大, 对于肺干细胞和肺癌干细胞研究主要借鉴其他干细胞和肿瘤干细胞表面标志和分选方法。目前还没有找到肺干细胞和肺癌干细胞特异性表型和有效干细胞分离方法, 同时也缺少合适的动物研究模型。对于肺干细胞向肺癌干细胞恶性转化和肺癌干细胞自我更新分子机制的研究目前也刚刚开始起步。以上种种问题限制了对肺干细胞和肺癌干细胞的进一步研究, 及其在肺癌和其他肺部疾病如肺气肿、慢阻肺等诊断治疗中的应用。因此, 应在建立合适的动物研究模型, 以及寻找特异表面标志和更为有效的分选方法上做更深入研究。

对肺干细胞和肺癌干细胞生物学和细胞学特征进行研究, 寻找两者特异表面分子标志, 阐明肺干细胞向肺癌干细胞恶性转化的机制和肺癌干细胞自我更新以及对放化疗抗性的分子机制, 有助于肺癌早期诊断以及寻找特异肿瘤靶点治疗药物。这些对促进肺癌的诊断、治疗和预后改善有着重要的临床意义。

[参 考 文 献]

- [1] Knight DA, Holgate ST. The airway epithelium: structural and functional properties in health and disease. *Respirology*, 2003, 8(4): 432-46
- [2] Mercer BA, Lemaitre V, Powell CA, et al. The epithelial cell in lung health and emphysema pathogenesis. *Curr Respir Med Rev*, 2006, 2(2): 101-42
- [3] Rawlins EL, Hogan BL. Epithelial stem cells of the lung: privileged few or opportunities for many? *Development*, 2006, 133(13): 2455-65
- [4] Bowden DH. Cell turnover in the lung. *Am Rev Respir Dis*, 1983, 128(2): S46-8
- [5] Hong KU, Reynolds SD, Watkins S, et al. *In vivo* differentiation potential of tracheal basal cells: evidence for multipotent and unipotent subpopulations. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004, 286(4): L643-9
- [6] Hong KU, Reynolds SD, Watkins S, et al. Basal cells are a multipotent progenitor capable of renewing the bronchial epithelium. *Am J Pathol*, 2004, 164(2): 577-88
- [7] Nakajima M, Kawanami O, Jin E, et al. Immunohistochemical and ultrastructural studies of basal cells, Clara cells and bronchiolar cuboidal cells in normal human airways. *Pathol Int*, 1998, 48(12): 944-53
- [8] Reynolds SD, Giangreco A, Power JH, et al. Neuroepithelial bodies of pulmonary airways serve as a reservoir of progenitor cells capable of epithelial regeneration. *Am J Pathol*, 2000, 156(1): 269-78
- [9] Reynolds SD, Hong KU, Giangreco A, et al. Conditional clara cell ablation reveals a self-renewing progenitor function of pulmonary neuroendocrine cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000, 278(6): L1256-63
- [10] Buckpitt A, Chang AM, Weir A, et al. Relationship of cytochrome P450 activity to Clara cell cytotoxicity. IV. Metabolism of naphthalene and naphthalene oxide in microdissected airways from mice, rats, and hamsters. *Mol Pharmacol*, 1995, 47(1): 74-81
- [11] Hong KU, Reynolds SD, Giangreco A, et al. Clara cell secretory protein expressing cells of the airway neuroepithelial body microenvironment include a label-retaining subset and are critical for epithelial renewal after progenitor cell depletion. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001, 24(6): 671-81
- [12] Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, et al. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell*, 2005, 121(6): 823-35
- [13] Adamson IY, Bowden DH. Derivation of type 1 epithelium from type 2 cells in the developing rat lung. *Lab Invest*, 1975, 32(6): 736-45
- [14] Evans MJ, Cabral LJ, Stephens RJ, et al. Transformation of alveolar type 2 cells to type 1 cells following exposure to NO₂. *Exp Mol Pathol*, 1975, 22(1): 142-50
- [15] Reddy R, Buckley S, Doerken M, et al. Isolation of a putative progenitor subpopulation of alveolar epithelial type 2 cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004, 286(4): L658-67
- [16] Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 2001, 414(6859): 105-11
- [17] Eramo A, Lotti F, Sette G, et al. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ*, 2008, 15(3): 504-14
- [18] Barth PJ, Koch S, Müller B, et al. Proliferation and number of Clara cell 10-kDa protein (CC10)-reactive epithelial cells and basal cells in normal, hyperplastic and metaplastic bronchial mucosa. *Virchows Arch*, 2001, 437(6): 648-55
- [19] Watkins DN, Berman DM, Burkholder SG, et al. Hedgehog signaling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature*, 2003, 422 (6929): 313-7
- [20] Giangreco A, Groot KR, Janes SM. Lung cancer and lung stem cells-strange bedfellows? *Am J Respir Crit Care Med*, 2007, 175(6): 547-53
- [21] Goodell MA, Brose K, Paradis G, et al. Isolation and

- functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating *in vivo*. *J Exp Med*, 1996, 183(4): 1797-806
- [22] Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, et al. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med*, 2001, 7(9): 1028-34
- [23] Hirschmann-Jax C, Foster AE, Wulf GG, et al. A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(39): 14228-33
- [24] Ho MM, Ng AV, Lam S, et al. Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells. *Cancer Res*, 2007, 67(10): 4827-33
- [25] Wu C, Alman BA. Side population cells in human cancers. *Cancer Lett*, 2008, 268(1): 1-9
- [26] Meng X, Li M, Wang X, et al. Both CD133⁺ and CD133⁻ subpopulations of A549 and H446 cells contain cancer-initiating cells. *Cancer Sci*, 2009, 100(6): 1040-6
- [27] Tirino V, Camerlingo R, Franco R, et al. The role of CD133 in the identification and characterisation of tumour-initiating cells in non-small-cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2009, 36 (3): 446-53
- [28] Chute JP, Muramoto GG, Whitesides J, et al. Inhibition of aldehyde dehydrogenase and retinoid signaling induces the expansion of human hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(31): 11707-12
- [29] Patel M, Lu L, Zander DS, et al. ALDH1A1 and ALDH3A1 expression in lung cancers: correlation with histologic type and potential precursors. *Lung Cancer*, 2008, 59(3): 340-9
- [30] Jiang F, Qiu Q, Khanna A, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer. *Mol Cancer Res*, 2009, 7(3): 330-8
- [31] Moreb JS, Baker HV, Chang LJ, et al. ALDH isozymes down regulation affects cell growth, cell motility and gene expression in lung cancer cells. *Mol Cancer*, 2008, 7: 87
- [32] Kitamura H, Okudela K, Yazawa T, et al. Cancer stem cell: implications in cancer biology and therapy with special reference to lung cancer. *Lung Cancer*, 2009, 66(3): 275-81
- [33] Kirstetter P, Anderson K, Porse BT, et al. Activation of the canonical Wnt pathway leads to loss of hematopoietic stem cell repopulation and multilineage differentiation block. *Nat Immunol*, 2006, 7 (10): 1048-56
- [34] Reynolds SD, Zemke AC, Giangreco A, et al. Conditional stabilization of betacatenin expands the pool of lung stem cells. *Stem Cells*, 2008, 26(5): 1337-46
- [35] You L, He B, Xu Z, et al. Inhibition of Wnt-2-mediated signaling induces programmed cell death in non-small-cell lung cancer cells. *Oncogene*, 2004, 23(36): 6170-4
- [36] Pepicelli CV, Lewis PM, McMahon AP. Sonic hedgehog regulates branching morphogenesis in the mammalian lung. *Curr Biol*, 1998, 8(19): 1083-6
- [37] Taipale J, Beachy PA. The Hedgehog and Wnt signaling pathways in cancer. *Nature*, 2001, 411(6835): 349-54
- [38] Watkins DN, Berman DM, Burkholder SG, et al. Hedgehog signaling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature*, 2003, 422 (6929): 313-7
- [39] Collins BJ, Kleeberger W, Ball DW. Notch in lung development and lung cancer. *Semin Cancer Biol*, 2004, 14(5): 357-64
- [40] Ito T, Udaka N, Yazawa T, et al. Basic helix-loop-helix transcription factors regulate the neuroendocrine differentiation of fetal mouse pulmonary epithelium. *Development*, 2000, 127(18): 3913-21
- [41] Konishi J, Kawaguchi KS, Vo H, et al. γ -secretase inhibitor prevents Notch3 activation and reduces proliferation in human lung cancers. *Cancer Res*, 2007, 67(17): 8051-7
- [42] Zheng Q, Qin H, Zhang H, et al. Notch signaling inhibits growth of the human lung adenocarcinoma cell line A549. *Oncol Rep*, 2007, 17(4): 847-52
- [43] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin*, 2009, 59(4): 225-49